

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000049

International filing date: 10 January 2005 (10.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0400191  
Filing date: 09 January 2004 (09.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 7 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

**INPI** 9 JAN 2004  
**INPI** 75 INPI PARIS 34 SP  
 0400191

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
 75800 Paris. Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**verfa**  
 N° 11354\*03

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

page 1/2

**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 0 W / 210502

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| REMISE DES PIÈCES<br>DATE<br>LIEU<br>N° D'ENREGISTREMENT<br>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI<br>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE<br>PAR L'INPI<br>- 9 JAN. 2004<br>Vos références pour ce dossier<br>(facultatif) CP 61.127  |  | Réservé à l'INPI<br>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE<br>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE<br>Cabinet ARMENGAUD AINE<br>3, Avenue Bugeaud<br>75116 PARIS   |  |
| Confirmation d'un dépôt par télécopie<br><input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie   |  |  |  |
| 2 NATURE DE LA DEMANDE<br>Demande de brevet<br>Demande de certificat d'utilité<br>Demande divisionnaire<br>Demande de brevet initiale<br>ou demande de certificat d'utilité initiale<br>Transformation d'une demande de<br>brevet européen Demande de brevet initiale           |  | Cochez l'une des 4 cases suivantes<br><input checked="" type="checkbox"/><br><input type="checkbox"/><br><input type="checkbox"/><br><input type="checkbox"/><br>N° _____ Date _____<br>N° _____ Date _____<br>N° _____ Date _____   |  |
| 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)<br>Procédé de production de caroténoïdes et bactéries mises en oeuvre  |  |  |  |
| 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ<br>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE<br>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE<br>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE  |  | Pays ou organisation _____ N° _____<br>Date _____<br>Pays ou organisation _____ N° _____<br>Date _____<br>Pays ou organisation _____ N° _____<br>Date _____<br><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»  |  |
| 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)<br>Nom ou dénomination sociale<br>Prénoms<br>Forme juridique<br>N° SIREN<br>Code APE-NAF<br>Domicile ou siège<br>Rue<br>Code postal et ville<br>Pays<br>Nationalité<br>N° de téléphone (facultatif)<br>Adresse électronique (facultatif) |  | <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale<br><input type="checkbox"/> Personne physique<br>Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.)<br>Etablissement Public<br>213, rue La Fayette<br>17 54 80 Paris cedex 10<br>FRANCE<br>Française<br>N° de télécopie (facultatif)<br><input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» |  |

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

**BR2**

|  |                      |   |                   |
|--|----------------------|---|-------------------|
| REMISE DES PIÈCES<br>DATE <b>9 JAN 2004</b><br>LIEU <b>75 INPI PARIS 34 SP</b><br>N° D'ENREGISTREMENT <b>0400191</b><br>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI |                      | Réservé à l'INPI  | DB 540 W / 210502 |
| <b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>  |                      |   |                   |
| Nom  |                      | PEAUCELLE   |                   |
| Prénom   |                      | Chantal   |                   |
| Cabinet ou Société   |                      | Cabinet ARMENGAUD AINE  |                   |
| N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel  |                      | 92-1189   |                   |
| Adresse  | Rue                  | 3, Avenue Bugeaud   |                   |
|  | Code postal et ville | 75 116 / PARIS  |                   |
|  | Pays                 | FRANCE  |                   |
| N° de téléphone (facultatif)   |                      | 01-45-53-05-50  |                   |
| N° de télécopie (facultatif)   |                      | 01-45-53-80-21  |                   |
| Adresse électronique (facultatif)  |                      | armengau@club-internet.fr   |                   |
| <b>7 INVENTEUR(S)</b>  |                      |   |                   |
| Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes  |                      | <input type="checkbox"/> Oui<br><input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)   |                   |
| <b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>  |                      |   |                   |
| Établissement immédiat ou établissement différé  |                      | <input checked="" type="checkbox"/> Oui<br><input type="checkbox"/> Non   |                   |
| Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)  |                      | Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt<br><input type="checkbox"/> Oui<br><input checked="" type="checkbox"/> Non   |                   |
| <b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>  |                      | Uniquement pour les personnes physiques<br><input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)<br><input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): RG |                   |
| <b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>   |                      | <input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences  |                   |
| Le support électronique de données est joint   |                      | <input checked="" type="checkbox"/> Oui<br><input type="checkbox"/> Non   |                   |
| La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe                          |                      | <input checked="" type="checkbox"/> Oui<br><input type="checkbox"/> Non   |                   |
| Si vous avez utilisé l'imprimé ci-joint, indiquez le nombre de pages jointes   |                      | 1   |                   |

11 SIGNATURE DU DEMANDeur  
ou du MANDATAIRE

12 VISE DE LA PREFECTURE  
ou de l'INPI



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

BR/SUITE

REMISE DES PIÈCES  
DATE

LIEU

9 JAN 2004

N° D'ENREGISTREMENT  
75 INPI PARIS 34 SP  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Réservé à l'INPI

0400101

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 0 W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)

CP 61.127

#### 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

#### 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale☐ Personne physiqueNom  
ou dénomination sociale

Commisariat à l'Energie Atomique (C.E.A)

Prénoms

Forme juridique

Etablissement Public

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

31-33 rue de la Fédération

Code postal et ville

1715171512 PARIS cedex 15

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

#### 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☐ Personne morale☐ Personne physiqueNom  
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE**  
(Nom et qualité du signataire)

Mandataire: Chantal PEAUCELLE  
92-1189  
Paris, le 9 janvier 2004

VISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI  
**L. MARIELLO**

De plus, de par leurs propriétés antioxydantes et leur rôle de photo protection, ils sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique pour l'obtention entre autre de crème solaire protectrice et de produits bronzants. Il existe déjà dans certains pays toute une série de produits dérivés de la canthaxanthine, du  $\beta$ -carotène et du lycopène, commercialisés dans les instituts de beauté et de body-building. Ces caroténoïdes ont également été décrits comme possédant des propriétés anti-inflammatoires. On trouve une

La synthèse actuelle de ces caroténoïdes est principalement réalisée par voie chimique. Etant donné la tendance du consommateur à préférer les produits ayant une origine naturelle, il existe donc un marché potentiel pour des caroténoïdes de provenance végétale ou microbienne. De plus, il apparaît que les configurations isomériques de certains caroténoïdes produits par voie chimique ne correspondent pas aux principaux isomères retrouvés dans la nature. Cette différence peut s'avérer très importante car elle est susceptible d'entraîner une bio-assimilation supérieure des caroténoïdes d'origine naturelle par rapport à ceux issus de la synthèse chimique.

La voie de biosynthèse de ces 4 principaux caroténoïdes (lycopène,  $\beta$ -carotène, astaxanthine, canthaxanthine) est présentée dans la figure 1. Le lycopène synthétisé grâce à l'action successive des enzymes CrtE, CrtB et CrtI est un intermédiaire commun aux 3 autres caroténoïdes. La synthèse du  $\beta$ -carotène peut être ainsi réalisée à partir du lycopène grâce à l'enzyme CrtY, celle de la canthaxanthine grâce aux enzymes CrtY et CrtW et celle de l'astaxanthine grâce aux enzymes CrtY, CrtW et CrtZ.

Plusieurs bactéries ont été décrites pour leur capacité à produire l'un de ces 4 caroténoïdes (*Brevibacterium*, *Agrobacterium auriantiacum*, *Erwinia uredovora*, *Erwinia herbicola*, *Myxococcus xanthus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bradyrhizobium* ...).

En particulier, des travaux antérieurs des inventeurs, qui ont fait l'objet d'un dépôt aux Etats-Unis sous le numéro US 60/297,247, ont porté sur la souche *Bradyrhizobium* ORS278. Ces travaux ont démontré l'existence d'un cluster de gènes (crtE, crtY, crtI, crtB, crtW) intervenant dans la voie de biosynthèse de la canthaxanthine. Ces différents gènes, une fois introduit chez *E. coli*, se sont avérés fonctionnel.

À l'exception de *Bradyrhizobium*, qui synthétise une faible quantité de photosystème, ces bactéries sont généralement des bactéries non-photosynthétiques qui accumulent de faibles quantités de produits et qui ont bien souvent un taux de  
5 croissance limité. La nature de la souche productrice constitue donc un obstacle majeur pour assurer une productivité suffisamment intéressante pour un industriel.

Par ailleurs, ces bactéries ne produisent en général qu'un seul de ces 4 caroténoïdes. Ceci implique pour un industriel  
10 voulant produire un panel de ces 4 principaux caroténoïdes d'utiliser différentes souches bactériennes qui vont chacune exiger des conditions bien particulières de culture et de production. D'autre part, la culture de différentes souches sur un même site peut entraîner de nombreuses difficultés  
15 logistiques liées aux problèmes de contamination.

Enfin, les caroténoïdes sont des composés hydrophobes qui ne peuvent être stockés dans la cellule que dans un environnement lipophile, généralement des compartiments membranaires. Les bactéries produisant des caroténoïdes  
20 d'intérêt industriel possèdent en général une membrane interne faiblement développée. Cette propriété, qui limite donc la quantité de caroténoïdes que l'on peut accumuler dans ces cellules, constitue l'un des problèmes majeurs pour une utilisation industrielle de ces bactéries.

25 Les travaux des inventeurs les ont donc amenés à rechercher une bactérie pouvant synthétiser suivant les conditions de cultures et/ou suivant les gènes caroténoïdes introduits dans celle-ci, l'ensemble de ces 4 principaux caroténoïdes et ceci en palliant les défauts des autres  
30 bactéries.

Les bactéries photosynthétiques présentent des avantages nombreux : une vitesse de croissance très rapide et une très faible consommation en nutriments. Les caroténoïdes, qui sont des pigments naturels, sont très appréciés par l'industrie alimentaire et pharmaceutique.



jouent un rôle essentiel dans son fonctionnement. La forte activité photosynthétique est accompagnée de la synthèse en grande quantité de caroténoïdes photosynthétiques associée à la mise en place de membranes intracytoplasmiques en abondance

5 constituant une zone de stockage importante pour les caroténoïdes.

Néanmoins, ces bactéries ne synthétisent en général qu'un seul pigment, la spirilloxanthine ou le sphéroïdène, qui ne présentent pas, à l'heure actuelle, d'intérêt industriel.

10 Afin d'obtenir un microorganisme producteur de lycopène,  $\beta$ -carotène, canthaxanthine ou astaxanthine, les inventeurs ont exploité le potentiel que présentent les bactéries photosynthétiques en détournant la voie de synthèse endogène du caroténoïde photosynthétique vers la synthèse de

15 caroténoïdes non photosynthétiques c'est à dire non associé au photosystème, chez ces bactéries:  $\beta$ -carotène, canthaxanthine ou astaxanthine.

La présente invention est donc relative à un procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques choisis parmi

20 le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 25 i. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- ii. Insertion des gènes suivants :
- 30 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

- iii. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées, et,
- iv. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.

En effet, la bactérie continue de synthétiser de manière résiduelle du lycopène, caroténoïde photosynthétique, qui permet à celle-ci de maintenir son activité de photosynthèse en remplaçant dans le photosystème le caroténoïde photosynthétique synthétisé de manière endogène.

En outre, il peut également être nécessaire de déléter dans certaines bactéries le crtA. Ce sera le cas pour les 25 bactéries synthétisant du lycopène-2-one. (voir figure 1)

De préférence, les bactéries photosynthétiques sont les suivantes : *Rubrivivax gelatinosus*, *Rhodospirillum rubrum*,  
*Rhodospirillum moliscianum*, *Rhodospirillum salinarum*,  
*Rhodospirillum mediosalinum*, *Rhodospirillum sodomense*,  
 Rhodocista centenaria, *Rhodospira trueperi*, *Rhodopseudomonas*  
*nalustris*. *Rhodopseudomonas acidophila*. *Rhodopseudomonas*  
*juliae*. *Rhodopseudomonas erythroblastica*. *Spirillum volutans*

Plus particulièrement, le procédé selon l'invention propose des conditions de culture assurant une production à un niveau satisfaisant de ces différents caroténoïdes. En particulier, il s'agit d'un procédé de synthèse de  
5 canthaxanthine ou d'astaxanthine, caractérisé en ce que les conditions de la mise en culture des bactéries sont séquentielles et comportent les étapes suivantes :

- a. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées dans un premier temps en anaérobiose sous  
10 éclaircissement,
- b. Puis, dans un second temps en aérobiose ou en microaérobiose, à l'obscurité.

En effet, chez les bactéries photosynthétiques, les gènes photosynthétiques, incluant les gènes *crtE*, *crtB*, et *crtI* de  
15 la voie de biosynthèse du lycopène sont sous le contrôle de l'oxygène et de la lumière. En particulier, chez certaines souches ces gènes ne s'expriment pas à l'obscurité et sont inhibés par la présence d'oxygène (> à 8%). Cette répression par l'oxygène résulte d'un facteur de transcription appelé  
20 PpsR qui à forte pression partielle en oxygène se fixe sur les régions promotrices des gènes photosynthétiques, dont les gènes *crt*, empêchant ainsi leur transcription.

En revanche, l'absence de dioxygène est défavorable à la production de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine. En  
25 effet, la réaction enzymatique catalysée par les enzymes CrtW ( $\beta$ -carotène kétolase) ou CrtZ ( $\beta$ -carotène hydroxylase) intervenant dans la voie de biosynthèse de ces 2 caroténoïdes nécessite de l'oxygène (voir Figure 1). Il est donc nécessaire pour permettre la synthèse de canthaxanthine et d'astaxanthine  
30 de trouver un compromis au niveau des conditions de culture afin d'assurer d'une part la synthèse de l'intermédiaire lycopène et d'autre part sa transformation en canthaxanthine ou en astaxanthine.

Avantageusement, les étapes a et b des conditions de culture permettant d'obtenir préférentiellement de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine sont réitérées successivement. Une telle itération permet l'accumulation des caroténoïdes dans les cellules.

Alternativement, le procédé selon l'invention permet la production de  $\beta$ -carotène si l'on modifie les conditions de culture. Ces conditions photosynthétiques de mise en culture sont alors les suivantes :

- 10 a. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en anaérobiose sous éclaircment.

En effet, le fonctionnement de l'enzyme CrtY (lycopène cyclase) qui permet la transformation de lycopène en  $\beta$ -carotène n'étant pas oxygène-dépendante, l'absence de l'étape b des conditions de culture pour la canthaxanthine ou l'astaxanthine permet d'arrêter la synthèse au stade du  $\beta$ -carotène.

Une seule bactérie permet donc de synthétiser à la fois du lycopène et préférentiellement, soit du  $\beta$ -carotène, soit de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine selon les gènes introduits et les conditions de culture.

Alternativement, les conditions de culture permettant d'obtenir préférentiellement de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine peuvent être réalisées en conditions de microaérobiose sous éclaircment en une seule étape.

En condition de microaérobiose, le pourcentage de dioxygène est de préférence compris entre 1 et 10%, plus particulièrement, 3 à 8%, bornes incluses.

Afin de s'affranchir des limitations dues à la régulation de la synthèse par le dioxygène, l'invention propose également un procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques

Le procédé selon l'invention permet de synthétiser de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine en conditions de microaérobiose sous éclaircment en une seule étape.

photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce que le procédé comporte les étapes suivantes :

- 5 i. Mise en œuvre de mutants de bactéries photosynthétiques dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène,
- 10 ii. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,
- 15 iii. Insertion des gènes suivants :
  - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,
  - soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
  - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
- 20 iv. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en aérobiose ou microaérobiose afin de synthétiser de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine ou mise en culture en condition d'anaérobiose afin de synthétiser du  $\beta$ -carotène, et,
- 25 v. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.
- 30 Les mutants dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène sont obtenus en particulier par délétion du gène codant pour le facteur de transcription PpsR, ledit facteur réprimant l'expression de certains gènes crt à forte pression partielle en dioxygène.
- Avantageusement, les bactéries mises en œuvre dans le procédé sont du genre *Rhodopseudomonas*, de préférence de l'espèce, *Rhodopseudomonas palustris*.

Certaines bactéries ne synthétisent pas de lycopène, mais un intermédiaire plus en amont dans la voie de synthèse des

caroténoïdes. Il est alors possible de modifier ces bactéries de manière à les faire synthétiser du lycopène.

Les bactéries photosynthétiques du procédé selon l'invention sont alors obtenues à partir de bactéries  
5 photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un  
10 gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

Les bactéries sont préférentiellement : *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter veldkampii*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter azotoformans*, *Rhodobacter blasticus*, *Rhodovulum*  
15 *sulfidophilum*, *Rhodovulum adriaticum*, *Rhodovulum euryhalinum*, *Rhodovulum strictum* ...

Dans une telle hypothèse, les gènes à déléter sont identiques à ceux cités précédemment. En effet, les dérivés du sphéroïdène sont obtenus à partir du neurosporène (le crtI  
20 endogène code pour une phytoène désaturase assurant seulement 3 étapes successives de désaturation du phytoène). Les gènes codant pour les premières enzymes mises en œuvre par la suite sont le crtC, le crtD et/ou le CrtF. (voir figure 1)

En outre, il peut également être nécessaire de déléter  
25 dans certaines bactéries le crtA. Ce sera le cas pour les bactéries synthétisant du  $\zeta$ -carotène-2-one ou du neurosporène-2-one. (voir figure 1)

De manière avantageuse, l'insertion des gènes crtY, crtZ et/ou crtW du procédé selon l'invention est réalisée dans la  
30 zone des gènes au moins partiellement déletés.

Alternativement, les gènes crtY, crtZ et/ou crtW pourront également être insérés dans le génome.

concomitante, au moins du lycopène, du  $\beta$ -carotène et de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine, caractérisées en ce que lesdites bactéries sont susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'invention.

5 En particulier, ces bactéries photosynthétiques synthétisant au moins un caroténoïde dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, sont caractérisées en ce qu'elles comportent les mutations suivantes :

10 i. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

ii. Insertion des gènes suivants :

- 15 - soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,  
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,  
- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène.

20 Alternativement, il s'agit d'un mutant de bactéries photosynthétiques synthétisant au moins un caroténoïde dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, dont la synthèse du photosystème n'est plus réprimée par le dioxygène, produisant de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine,  
25 caractérisé en ce qu'il comporte les mutations suivantes:

i. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

30 ii. Insertion des gènes suivants :

- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,
- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène.

Ces bactéries ou mutants peuvent être obtenus à partir de bactéries ou de mutants produisant au moins un caroténoïde dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ou mutants ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

De manière surprenante, il a été constaté que ces bactéries ou mutants de bactéries photosynthétiques, bien qu'ayant leur voie de synthèse du caroténoïde photosynthétique endogène détournée vers la synthèse d'un caroténoïde non photosynthétique d'intérêt ont leur activité photosynthétique maintenue.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples avec références aux figures suivantes :

- la figure 1 représente le schéma de synthèse des différents caroténoïdes visés par l'invention,

- la figure 2 présente le schéma de synthèse de la stratégie de construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC :: crtY :: crtW :: apha3

- la figure 3 présente le schéma de synthèse de la stratégie de construction du plasmide pJQ200mp18/crtDC :: crtY :: crtZ :: crtW :: apha3, et

Il est bien entendu que les schémas de synthèse des caroténoïdes présentés dans les figures 1, 2 et 3 sont illustratifs et ne doivent pas être interprétés de manière limitative.



CEA001ΔcrtDC ::crtY ::crtW sous différentes conditions de culture.

**Exemple 1 : construction d'une souche mutante de**  
**5 Rhodopseudomonas palustris produisant du lycopène**

La séquence du cluster de gènes crt de *R. palustris* impliqué dans la synthèse de la spirilloxanthine est accessible sur Internet à l'adresse suivante <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Acc Number : BX572597).

10 Comme dans *Bradyrhizobium* ORS278, les gènes crtE, crtI, crtB, crtC, crtD, crtF sont présents et organisés en 3 opérons

La stratégie générale de construction de cette souche mutante va consister à disrupter les gènes crtD et crtC en y  
15 insérant une cassette codant un gène de résistance à la kanamycine (gène apha3).

**1<sup>ère</sup> étape : isolement et clonage des gènes crtDC de *R. palustris*, :**

20 Une région correspondant à une partie des gènes crtDC de *R. palustris* a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces :

crtD.R.palu.XhoI.f : GAGCTCGAGTTCGCCGGCATCGGCCTGAACCTCTC  
(SEQ ID N°1)

CrtC.R.palu.XhoI.r : CTGCTCGAGAGGAGTATTACGGACTGATCGAAC  
25 (SEQ ID N°2)

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de restriction XhoI de part et d'autre du produit de PCR.

Les amplifications sont réalisées avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx  
30 DNA Polymerase).

Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s puis 55°C pendant 30s puis 68°C pendant 3 min), suivis d'une étape

finale d'élongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle  
1 µl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté  
dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine  
aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape  
5 est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur  
pGEM-T utilisé ultérieurement).

Le produit de PCR ainsi obtenu est cloné dans le vecteur  
de clonage pGEM-T (commercialisé par la société Promega®)  
suivant le protocole du fournisseur. Le plasmide obtenu est  
10 nommé pGEM-T/*crtDC.XhoI*).

### 2<sup>ème</sup> étape : Construction du plasmide pJQ200mp18/*crtDC*

La région correspondant aux gènes *crtDC* de *R. palustris*  
est libérée par digestion *XhoI* du plasmide pGEM-T/*crtDC.XhoI*  
15 puis ligaturée dans le vecteur suicide pJQ200mp18 linéarisé  
par digestion *SalI*. Ce plasmide contient le gène suicide *sacB*  
qui permet de sélectionner sur saccharose les clones pour  
lesquels un événement de double « crossing over » a bien eu  
lieu (Quandt, J. & Hynes, M. F. « Versatile suicide vectors  
20 which allow direct selection for gene replacement in gram-  
negative bacteria » ; Gene 127, 15-21, 1993).

### 3<sup>ème</sup> étape: Construction du plasmide pJQ200mp18/*crtDC* : *aphA-3*

25 Le gène *aphA-3* codant une résistance à la kanamycine est  
libéré du plasmide pUC4K commercialisé par la société  
Amersham® par digestion avec l'enzyme *SalI*. Il est alors  
inséré dans le plasmide pJQ200mp18/*crtDC* linéarisé par *SalI*.  
Il est à noter que cette dernière digestion *SalI* entraîne une  
30 délétion d'un fragment de 618pb correspondant à l'extrémité 5'  
du gène *crtD* et l'extrémité 3' du gène *crtC*.

4ième étape : Construction d'une souche mutante de *R. palustris* contenant la cassette *apha3* au niveau des gènes *crtD*, *crtC*.

5 Le plasmide précédent pJQ200mp18 /*crtDC* : : *aphA-3* est délivré dans la souche sauvage de *R. palustris* (CEA001) par conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1 contenant la contruction. Les clones conjugants sont sélectionnés sur milieu Hutner (R. K. Clayton « Towards the isolation of a  
10 photochemical rection center in *Rhodopseudomonas sphaeroides* » ; Biochim. Biophys. Acta 75 : 312-318, 1963) contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbenicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjugant sur milieu Hutner  
15 contenant du saccharose 5% et de la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que l'insertion de la cassette *apha3* au niveau des gènes *crtD* et *crtC* de *R. palustris*.

La production de lycopène en grande quantité a été  
20 constatée chez les bactéries ainsi mutées. Par ailleurs, le caractère photosynthétique de la bactérie est conservé.

Exemple 2 : Construction d'une souche mutante de  
*Rhodopseudomonas palustris* produisant du  $\beta$ -carotène ou de la  
25 *canthaxanthine*

Schéma de construction

La stratégie de construction de cette souche mutante est résumée dans la figure 2.

Dans cette figure, les légendes des étapes sont les  
30 suivantes :

1<sup>ère</sup> étape : Amplification des gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278, ainsi que des gènes *crtDC* de *R. palustris*. Clonage des produits de PCR dans le plasmide p-GEMT (Promega).

2<sup>ème</sup> étape : Libération par *SalI* de la cassette *apha3* du plasmide puc4K commercialisé par Amersham. Insertion au niveau du site *XhoI* unique présent en aval de *crtW*.

3<sup>ème</sup> étape : Libération des gènes *crtW* et *apha3* par *KpnI/EcoRI*. Insertion dans le plasmide pGEM-T/*crtY* linéarisé par les mêmes enzymes.

4<sup>ème</sup> étape : Libération des gènes *crtY*, *crtW* et *apha3* par *BglIII/EcoRI*. Insertion dans le plasmide pGEM-T/*crtDC* linéarisé par les mêmes enzymes.

5<sup>ème</sup> étape : Libération des gènes *crtDC*, *crtY*, *crtW* et *apha3* par *XbaI*. Insertion dans le plasmide pJQ200mp18 linéarisé par la même enzyme

#### A. Stratégie de Construction

La stratégie globale pour construire une souche mutante de *R. palustris* produisant soit du  $\beta$ -carotène soit de la canthaxanthine a consisté à disrupter les gènes *crtD*, *crtC* de *R. palustris* en y insérant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 ainsi qu'un gène *aphA-3* codant pour une résistance à la kanamycine.

Suivant les conditions d'oxygénation de la culture (voir exemple 3) l'enzyme *CrtW* transformant le  $\beta$ -carotène en canthaxanthine est fonctionnelle ou pas, ce qui conduit au choix à une accumulation de  $\beta$ -carotène ou de canthaxanthine.

1<sup>ère</sup> étape : isolement et clonage des gènes *crtDC* de *R. palustris*, *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 :

Une région correspondant à une partie des gènes *crtDC* de *R. palustris* a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces :

*crtD.R.palu.XbaI.f* : GAGTCTAGATTCGCCCGCATCGGCGTGAACCTTCTC  
(SEQ ID N°3)

*crtD.R.palu.XbaI.r* : ATCTAGAGGAGAGTTCATCTTCCTGATC

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de restriction *XbaI* de part et d'autre du produit de PCR.

Le gène *crtY* de *Bradyrhizobium* ORS278 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces suivant:

5        *crtY*.278.f :

TGAGATCTGGAGGCTGTCGTCATGAGTCGAGATGCCGACGTCATCGTC (SEQ ID N°5)

*crtY*.278.r : GTGAATTCCTGGTACCTCATGGGGTCTTGAAGGCGCTCGCCTCA  
(SEQ ID N°6)

10       Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS et un site de restriction *BglII* en 5' ainsi qu'un site de restriction *KpnI* et *EcoRI* en 3' du produit de PCR.

Le gène *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 a été amplifié à l'aide du couple d'amorces suivant :

15       *crtW*.ORS278.f :

CGGTACCGGGAGCTTTGCCAATGCATGCAGCAACCGCCAAGGCTAC (SEQ ID N°7)

*crtW*.ORS278.r : GTGAATTCATGCTCGAGCGGGTTTAGTCACGCCTTTCCAG  
(SEQ ID N°8)

20       Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS et un site de restriction *Kpn I* en 5' ainsi qu'un site de restriction *Xho I* et *EcoR I* en 3' du produit de PCR.

25       Les amplifications sont réalisées avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx DNA Polymerase).

30       Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s puis 55°C pendant 30s puis 68°C pendant 3 min), suivi d'une étape finale d'élongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle 1µl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape

est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T utilisé ultérieurement).

Les 3 produits de PCR ainsi obtenus sont clonés dans le vecteur de clonage pGEM-T (commercialisé par la société Promega®) suivant le protocole du fournisseur. Les plasmides obtenus sont nommés pGEM-T/*crtDC.XbaI* ; pGEM-T/*crtY* ; pGEM-T/*crtW*

10 3 2<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/*crtW* : :*aphA*-

Le gène *aphA*-3 codant une résistance à la kanamycine est libéré du plasmide pUC4K commercialisé par la société Amersham par digestion avec l'enzyme *SalI*. Il est alors inséré dans le plasmide pGEM-T/*crtW* linéarisé par *XhoI*.

15

3<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/*crtY* : :*crtW* : : *aphA*-3

La construction précédente contenant les gènes *crtW* et *aphA*-3 est libérée par double digestion *KpnI/EcoRI* puis insérée dans le plasmide pGEM-T/*crtY* linéarisé par le même couple d'enzymes de restriction.

20

4<sup>ième</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/*crtDC* : :*crtY* : : *crtW* : : *aphA*-3

25 La construction précédente contenant les gènes *crtY*, *crtW* et *aphA*-3 est libérée par double digestion *BglIII/EcoRI* puis insérée dans le plasmide pGEM-T/*crtDC* linéarisé par le même couple d'enzyme de restriction. La digestion de pGEM-T/*crtDC* par *BglIII/EcoRI* entraîne une délétion d'un fragment de 30 1232 pb correspondant à une partie importante des gènes *crtD* et *crtC*.

5<sup>ème</sup> étape : Construction du plasmide pJQ200mp18  
/crtDC :: crtY :: crtW :: aphA-3

La construction précédente contenant les gènes crtDC, crtY, crtW et aphA-3 est libérée par digestion XbaI puis  
5 insérée dans le plasmide suicide pJQ200mp18 linéarisé par XbaI. Le plasmide pJQ200mp18 /crtDC :: crtY :: crtZ :: crtW :: aphA-3 est enfin transféré par électroporation dans la souche conjugative *Escherichia coli* S17.1.

10 6<sup>ème</sup> étape : Construction d'une souche mutante de *R. palustris* contenant les gènes crtY et crtW de *Bradyrhizobium* ORS278.

Le plasmide précédent pJQ200mp18 /crtDC :: crtY :: crtW :: aphA-3 est délivré dans la souche de *R. palustris* CEA001 par  
15 conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1 contenant la construction. Les clones conjugants sont sélectionnés sur milieu Hutner contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbénicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjugant sur milieu  
20 Hutner contenant du saccharose 5% et de la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que les gènes crtY, et crtW ont bien été insérés au niveau des gènes crtD et crtC. Un mutant est retenu pour la suite des expériences : *R.*  
25 *palustris* CEA001ΔcrtDC :: crtY :: crtW.

**B. Analyse des caroténoïdes produit par la souche mutante**  
*R. palustris* CEA001ΔcrtDC :: crtY :: crtW - essai dans  
différentes conditions de culture

30 Afin de déterminer le potentiel de la souche mutante de *R. palustris* CEA001ΔcrtDC :: crtY :: crtW à surproduire du β-carotène et de la canthaxanthine, une série d'essais préliminaires a été réalisée dans laquelle différentes conditions de culture ont été testées.

A : Flacon de 120 ml contenant 100 ml de milieu Hutner, 30°C - dégazé pour éliminer toute trace d'oxygène, et placé sous une lampe à incandescence de 100 Watts (conditions lumière, anaérobiose)

5 B : Flacon de 250 ml rempli de 50 ml de milieu Hutner, 30°C - agitation 170 RPM - placé dans une atmosphère où la teneur en oxygène peut être ajustée à 1, 5, 8 % (Conditions lumière, microaérobiose) ou 21% (Conditions lumière, aérobiose)

10 C : Après culture en anaérobiose pendant 2 jours suivant les conditions A, 50 ml sont transférés dans un erlenmeyer à baffles puis mis à agiter 170rpm à l'obscurité pendant une nuit pour fortement oxygéner la culture.

15 Après 3 jours de culture dans les différentes conditions testées, les caroténoïdes produits sont analysés par HPLC. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1 : production de caroténoïdes selon les conditions de culture chez le mutant *R. palustris*

CEA001AcrtDC ::crY ::crtW

| Conditions           | DO650 | Lycopène<br>mg/L | $\beta$ -carotène<br>mg/L | Canthaxanthine<br>mg/L |
|----------------------|-------|------------------|---------------------------|------------------------|
| A                    | 3,7   | 2,7              | 4,7                       | 0                      |
| B 1% O <sub>2</sub>  | 2,9   | 0,85             | 1,13                      | 0,1                    |
| B 5% O <sub>2</sub>  | 2     | 0,35             | 0,19                      | 0,32                   |
| B 8% O <sub>2</sub>  | 2,4   | 0,46             | 0,16                      | 0,41                   |
| B 21% O <sub>2</sub> | 1,8   | 0,12             | 0,05                      | 0,07                   |
| C                    | 3,7   | 2,4              | 3,8                       | 0,8                    |

15 Il apparaît clairement que les conditions d'aération et de lumière ont des effets très importants sur la production des caroténoïdes et la croissance de la souche. Les fortes variations de production observées entre les conditions de culture sont liées à la présence ou à l'absence d'oxygène et de lumière.



concentrations de caroténoïdes (lycopène et  $\beta$ -carotène) sont obtenues lorsque la bactérie est cultivée en condition aérobie (21%) en raison de la répression de la synthèse de l'appareil photosynthétique par l'oxygène. La présence d'importantes

5 quantités de  $\beta$ -carotène en conditions lumière, anaérobiose montre bien que le gène *crtY* d'ORS278 qui permet la transformation du lycopène en  $\beta$ -carotène est parfaitement fonctionnel. Par contre, on observe l'absence de production de canthaxanthine dans ces mêmes conditions. Ceci résulte du fait

10 que l'enzyme CrtW qui permet la transformation du  $\beta$ -carotène en canthaxanthine est une oxygénase qui a donc besoin d'oxygène pour fonctionner. En accord avec cette explication, la concentration de canthaxanthine augmente progressivement (de 0,32 à 0,41 mg/l) lorsque la teneur en oxygène passe de 5

15 à 8% avec une baisse concomitante de  $\beta$ -carotène (tableau I). Cette expérience démontre, d'une part la nécessité de la présence d'oxygène pour la formation de canthaxanthine à partir de  $\beta$ -carotène, d'autre part que l'enzyme CrtW d'ORS278 est également fonctionnelle chez ce mutant. La transformation

20 de  $\beta$ -carotène en canthaxanthine en fonction de la teneur en oxygène est aussi démontrée par le chromatogramme présenté sur la figure 4. Un autre argument en faveur d'une transformation du  $\beta$ -carotène en canthaxanthine de façon équimolaire en présence d'oxygène est présenté dans les conditions C, c'est-

25 à-dire en oxygénant la culture après croissance en anaérobiose, où il est possible de transformer une partie de ce  $\beta$ -carotène en canthaxanthine.

Ces premiers essais montrent bien qu'il est possible de produire de la canthaxanthine chez *R. palustris*. Par ailleurs,

30 en jouant sur les conditions d'aération, la quantité de  $\beta$ -carotène transformable en canthaxanthine devrait être proche de 5mg/l soit 6 fois plus que la quantité de canthaxanthine (0,8mg/l) obtenue en culture liquide avec la souche *Bradyrhizobium* ORS278. De plus, le temps de culture a été

### Schéma de construction

La stratégie de construction de cette souche mutante est résumée en figure 3.

Dans cette figure, les légendes des étapes sont les  
10 suivantes :

1<sup>ère</sup> étape : Amplification du gène *crtZ* de *Pseudomonas putida*. Clonage du produit de PCR dans le plasmide p-GEMT (Promega).

2<sup>ème</sup> étape : Libération par *KpnI* du gène *crtZ*. Insertion  
15 dans le site *KpnI* unique du plasmide pGEM-T/*crtY::crtW::apha3*.

3<sup>ème</sup> étape : Libération des gènes *crtY*, *crtZ*, *crtW* et *apha3* par *BglIII/EcoRI*. Insertion dans le plasmide pGEM-T/*crtDC* linéarisé par les mêmes enzymes.

4<sup>ème</sup> étape : Libération des gènes *crtDC*, *crtY*, *crtZ*, *crtW*  
20 et *apha3* par *XbaI*. Insertion dans le plasmide pJQ200mp18  
linéarisé par la même enzyme

## Construction

25 La stratégie générale consiste à insérer le gène *crtZ* de *Pseudomonas putida* dans la souche mutante précédemment construite de *R. palustris* contenant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278. L'insertion est faite au niveau du site unique de restriction *KpnI* présent entre les gènes *crtY* et *crtW*.

1<sup>er</sup> étape : Construction du plasma de rDNA-T/centr

1. The Commission is composed of three members appointed by the President of the United States, one member appointed by the Senate of the United States, and one member appointed by the House of Representatives of the United States.

amplifié à partir de l'ADN génomique de *Pseudomonas putida* à l'aide du couple d'amorces :

crtZ.Ps.putida.f :

CCTTTTGGTACCGGAGGACCGTTCCATGCTGTTCAATCTCGCCATATT (SEQ ID N°9)

5 crtZ.Ps.putida.r : GGGGTACCTCACGATTGGCTGCGCCTGCTGCGCAATTG  
(SEQ ID N°10)

Les amorces ont été conçues de façon à insérer un site de fixation du ribosome RBS en 5' et un site de restriction Kpn I en 5' et en 3' du produit de PCR.

10 L'amplification est réalisée avec une ADN polymérase haute fidélité commercialisée par Invitrogen® (Platinum Pfx DNA Polymerase).

Les conditions d'amplification sont les suivantes: après une étape initiale de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5  
15 min, 35 cycles de PCR sont effectués (94°C pendant 15s, puis 55°C pendant 30s, puis 68°C pendant 1 min), suivi d'une étape finale d'élongation (68°C pendant 7 min) au cours de laquelle  
1 µl de Taq polymérase classique (GoTaq, Promega®) est rajouté dans le tube de PCR afin d'insérer un résidu de déoxyadénosine  
20 aux extrémités 3' des fragments d'amplification (cette étape est indispensable pour permettre le clonage dans le vecteur pGEM-T utilisé ultérieurement).

Le produit de PCR ainsi obtenu est cloné dans le vecteur de clonage pGEM-T suivant le protocole du fournisseur. Le  
25 plasmide obtenu est nommé pGEM-T/crtZ.

2<sup>ème</sup> étape : Construction du plasmide pGEM-T/crtDC : : crtY : : crtZ : : crtW : : aphA-3

La construction précédemment obtenue pGEM-  
30 T/crtDC : : crtY : : crtW : : aphA-3 contenant les gènes crtW, crtY de *Bradyrhizobium* ORS278 et le gène de résistance à la kanamycine aphA-3 inséré dans les gènes crtDC de *R. palustris* est linéarisée par l'enzyme KpnI dont le site de restriction est situé entre les gènes crtW et crtY. Le gène crtZ cloné

dans le vecteur pGEM-T/*crtZ* est libéré par *KpnI*, puis inséré par ligation dans la construction précédente linéarisée.

### 3ième étape : Construction du plasmide pJQ200mp18

5 /*crtDC* : :*crtY* : : *crtZ* ::*crtW* : : *aphA-3*

La construction précédente contenant les gènes *crtDC*, *crtY*, *crtZ*, *crtW* et *aphA-3* est libérée par digestion *XbaI* puis insérée par ligation dans le plasmide suicide pJQ200 mp18 linéarisé par *XbaI*. Le plasmide pJQ200mp18  
10 /*crtDC* : :*crtY* : :*crtZ* ::*crtW* : :*aphA-3* est transféré par électroporation dans la souche conjugative *Escherichia coli* S17.1.

4ième étape : Construction d'une souche mutante de *R.*  
15 *palustris* CEA001 contenant les gènes *crtY* et *crtW* de *Bradyrhizobium* ORS278 et *crtZ* de *Pseudomonas putida*.

Le plasmide précédent pJQ200mp18 /*crtDC* : :*crtY* : :*crtZ* : :*crtW* : : *aphA-3* est délivré dans la souche *R. palustris* CEA001 par conjugaison avec la souche précédente *E. coli* S17.1  
20 contenant la construction. Les clones conjugants sont sélectionnés sur milieu Hutner contenant de la kanamycine 150µg/ml et de la carbénicilline 50µg/ml. Les clones double recombinants sont sélectionnés après repiquage des clones conjugants sur milieu Hutner contenant du saccharose 5% et de  
25 la kanamycine (150µg/ml). Une vérification par PCR est effectuée sur plusieurs clones recombinants afin de s'assurer que les gènes *crtY*, *crtZ* et *crtW* ont bien été insérés au niveau des gènes *crtD* et *crtC*.

En condition de culture en microaérobiose (8% d'oxygène),  
30 la production d'astaxanthine en grande quantité a été constatée chez les bactéries ainsi mutées.

RE V E N D I C A T I O N S

1. Procédé de synthèse de caroténoïdes non photosynthétiques choisis parmi le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine mettant en œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde  
5 photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

i. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la  
10 voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

ii. Insertion des gènes suivants :  
- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser  
15 est le  $\beta$ -carotène,

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le  
20 caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

iii. Mise en culture des bactéries ainsi modifiées, et,

iv. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s)  
25 dans les bactéries.

2. Procédé selon la revendication 1, de synthèse de canthaxanthine ou d'astaxanthine, caractérisé en ce que les conditions de mise en culture sont séquentielles et comportent les étapes suivantes :

30 c. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées dans un premier temps en anaérobiose sous éclaircissement,

d. Puis, dans un second temps en aérobiose en obscurité.

3. Procédé selon la revendication 1 de synthèse de  $\beta$ -carotène, caractérisé en ce que les conditions de mise en  
5 culture sont les suivantes :

b. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en anaérobiose sous éclaircment.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les étapes a et/ou b sont réalisées en conditions de  
10 microaérobiose sous éclaircment.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'en conditions de microaérobiose, le pourcentage de dioxygène est compris entre 1 et 10%, de préférence, 3 à 8%, bornes incluses.

15 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que l'on réitère les étapes a et b successivement.

7. Procédé de synthèse de caroténoïdes choisis parmi le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine ou l'astaxanthine, mettant en  
20 œuvre des bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène, caractérisé en ce que le procédé comporte les étapes suivantes :

25 i. Mise en œuvre de mutants de bactéries photosynthétiques dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène,

ii. Délétion, chez les bactéries, d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au  
30 niveau du lycopène.

iii. Insertion des gènes étrangers.

- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

5           - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

10           iv. Mise en culture desdites bactéries ainsi modifiées en aérobiose ou microaérobiose afin de synthétiser de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine ou mise en culture en condition d'anaérobiose afin de synthétiser du  $\beta$ -carotène, et,

          v. Extraction du ou des caroténoïde(s) contenu(s) dans les bactéries.

15           8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les mutants dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène sont obtenus par délétion du gène codant pour le facteur de transcription PpsR.

20           9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les bactéries sont du genre *Rhodopseudomonas*, de préférence de l'espèce, *Rhodopseudomonas palustris*.

25           10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1-8, caractérisé en ce que les bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le lycopène sont obtenues à partir de bactéries photosynthétiques produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de  
30           synthèse est le phytoène, le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le neurosporène, lesdites bactéries ayant subi éventuellement une délétion ou disruption du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'insertion des gènes crtY, crtZ et/ou crtW est réalisée dans la zone des gènes au moins partiellement délétés.

5 12. Bactérie photosynthétique produisant, de manière alternative ou concomitante, au moins du lycopène, du  $\beta$ -carotène et de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine, caractérisée en ce que ladite bactérie est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 1 ou la  
10 revendication 9 dans son rattachement à la revendication 1.

13. Bactérie photosynthétique caractérisée en ce qu'elle est obtenue selon le procédé suivant :

i. Mise en œuvre d'une bactérie photosynthétique synthétisant au moins un caroténoïde  
15 photosynthétique dont l'intermédiaire de synthèse est le lycopène,

ii. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à  
20 arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

iii. Insertion des gènes suivants :  
- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,  
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à  
25 synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,  
- soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène.

30 14. Mutant de bactérie photosynthétique caractérisé en ce qu'il est obtenu selon le procédé suivant



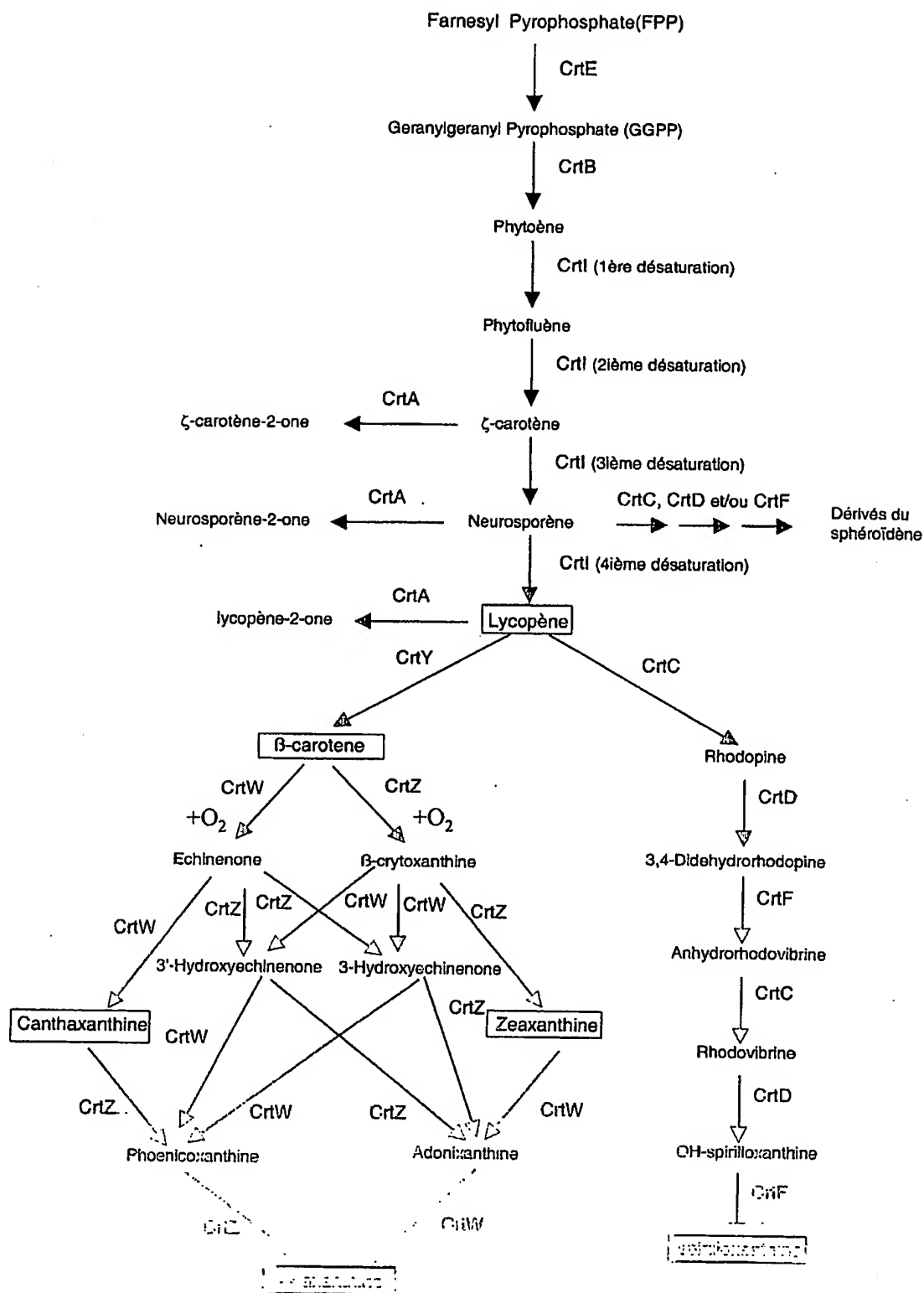
l'intermédiaire de synthèse est le lycopène, dont la photosynthèse n'est plus réprimée par le dioxygène, produisant de la canthaxanthine ou de l'astaxanthine,

5           ii. Délétion d'au moins une partie d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de synthèse endogène qui suit celle du lycopène de manière à arrêter ladite synthèse au niveau du lycopène,

10           iii. Insertion des gènes suivants :  
- soit le crtY si le caroténoïde à synthétiser est le  $\beta$ -carotène,  
- soit le crtY et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est la canthaxanthine ou le  $\beta$ -carotène,

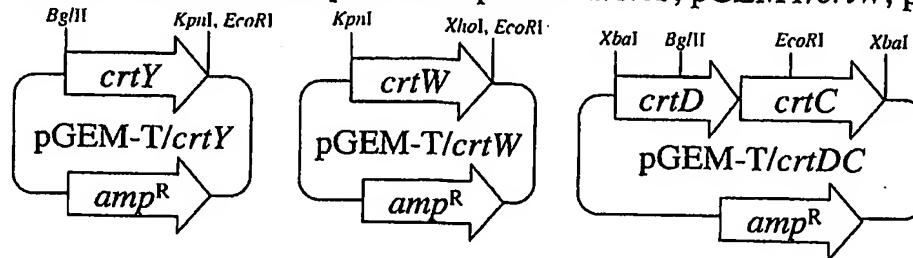
15           - soit le crtY, le crtZ et le crtW si le caroténoïde à synthétiser est l'astaxanthine ou le  $\beta$ -carotène.

15. Bactérie selon les revendications 12 ou 13, ou mutant selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est  
20   respectivement obtenu à partir de bactérie ou de mutant produisant au moins un caroténoïde photosynthétique dont l'un des intermédiaires de synthèse est le phytoène, le phytofluène, le  $\zeta$ -carotène ou le neurosporène, lesdits bactérie ou mutant ayant subi éventuellement une délétion ou disruption  
25   du gène crtI endogène, suivie d'une insertion d'un gène crtI exogène codant pour une phytoène désaturase assurant 4 étapes successives de désaturation du phytoène.

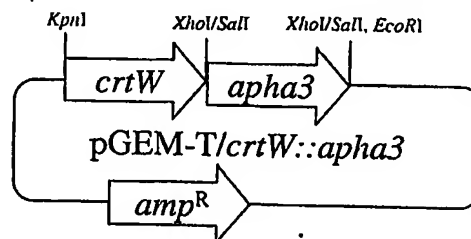


# Construction du plasmide pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtW::apha3*

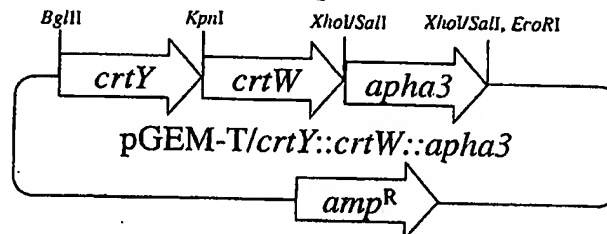
1er étape construction des plasmides pGEM-T/*crtY*, pGEM-T/*crtW*, pGEM-T/*crtDC*



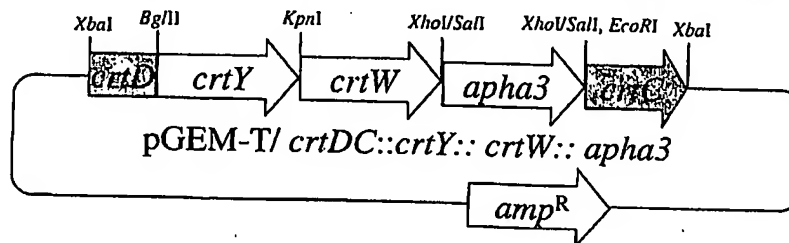
2ième étape construction du pGEM-T/*crtW::apha3*



3ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtY::crtW::apha3*



4ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtDC::crtY::crtW::apha3*



5ième étape construction du pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtW::apha3*

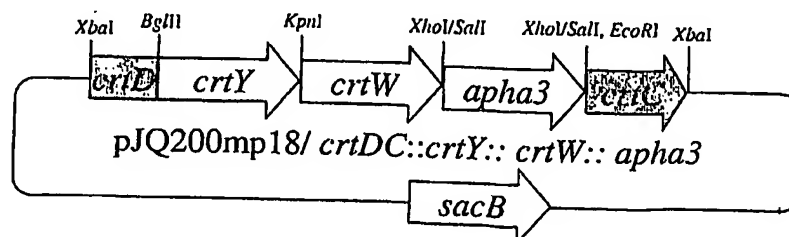
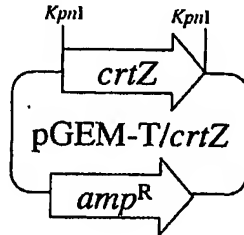


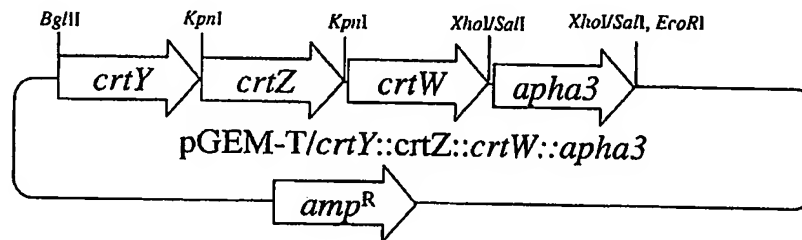
Figure 2

## Construction du plasmide pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtZ::crtW::apha3*

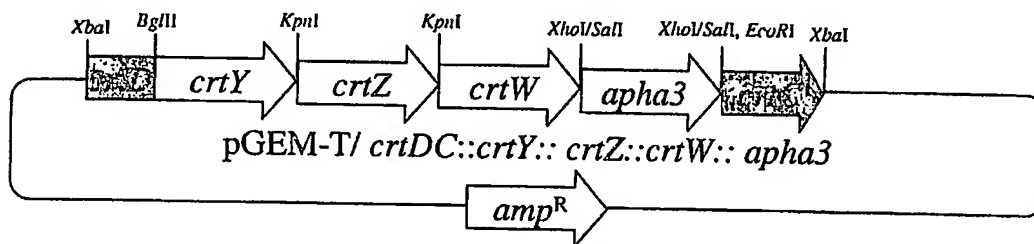
1er étape construction du plasmide pGEM-T/*crtZ*



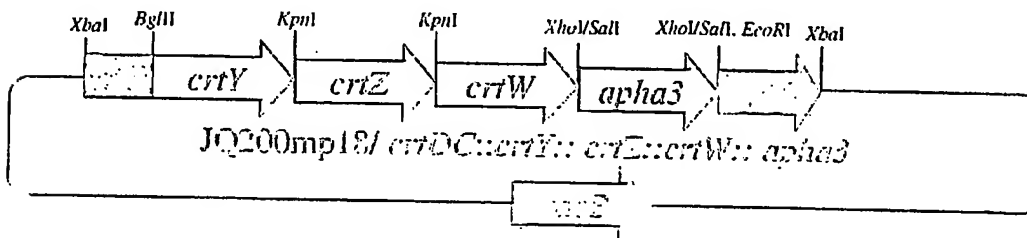
2ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtY::crtZ::crtW::apha3*



3ième étape construction du plasmide pGEM-T/*crtDC::crtY::crtZ::crtW::apha3*



4ième étape construction du pJQ200mp18/*crtDC::crtY::crtZ::crtW::apha3*



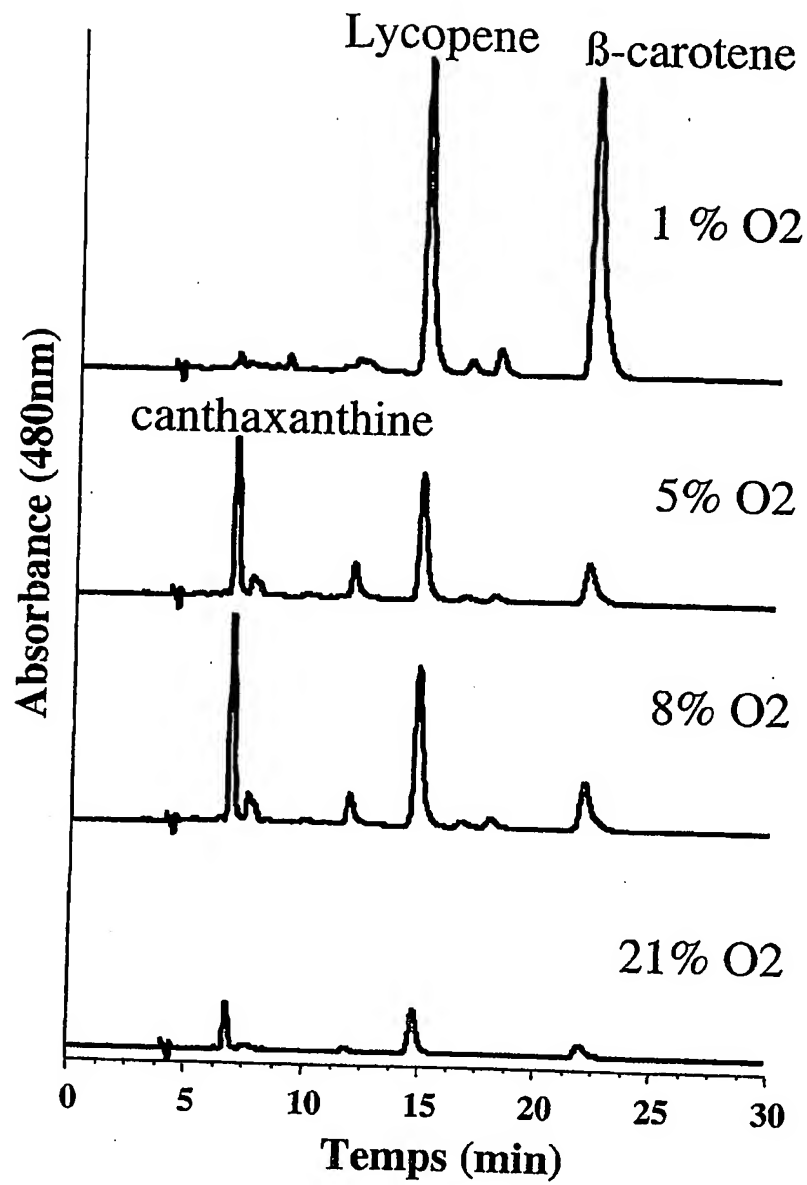


Figure 4

SEQUENCE LISTING

<110> Institut de recherche pour le développement (IRD)  
Commissariat à l'énergie atomique (CEA)  
<120> Production de caroténoïdes par des bactéries photosynthétiques  
<130> 61127  
<160> 10  
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 1  
gagctcgagt tcgccggcat cggcctgaac ttctc 35

<210> 2  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 2  
ctgctcgaga ggagtattac ggactgatcg aac 33

<210> 3  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 3  
gagtctagat tcgccggcat cggcctgaac ttctc 35

<210> 4  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 4  
ctgtctagaa ggagtattac ggactgatcg aac 33

<210> 5  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 5  
tgagatctgg aggctgtcgt catgagtcga gatgccgacg tcatcgto 48

<210> 6  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> primer

<210> 7  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 7  
cggtaccggg agctttgcca atgcatgcag caaccgcaa ggctac

46

<210> 8  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 8  
gtgaattcca tgctcgagcg ggtttagtca cgcctttcca g

41

<210> 9  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 9  
ccttttggtta ccggaggacc gttccatgct gttcaatctc gccatatt

48

<210> 10  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> primer

<400> 10  
ggggtacctc acgattggct gcgcctgctg cgcaattg

38



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

**cerfa**  
N° 11235\*03

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 0 W / 270601

|   |                             |                                     |
|---|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>  |                             | CP 61.127                           |
| <b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>   |                             | 04 00 191                           |
| <b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)<br>Procédé de production de caroténoïdes et bactéries mises en oeuvre |                             |                                     |
| <b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b><br>INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D)<br>COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (C.E.A)       |                             |                                     |
| <b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>  |                             |                                     |
| <b>1</b>  | <b>Nom</b>                  | FARDOUX                             |
|   | <b>Prénoms</b>              | Joël                                |
| <b>Adresse</b>  | <b>Rue</b>                  | Le Perou n°21                       |
|   | <b>Code postal et ville</b> | 13 14 13 10 SAINT MARTIN DE LONDRES |
| <b>Société d'appartenance (facultatif)</b>  |                             |                                     |
| <b>2</b>  | <b>Nom</b>                  | GIRAUD                              |
|   | <b>Prénoms</b>              | Eric                                |
| <b>Adresse</b>  | <b>Rue</b>                  | 228, chemin des lorlots             |
|   | <b>Code postal et ville</b> | 13 14 11 17 10 CASTELNAU LE LEZ     |
| <b>Société d'appartenance (facultatif)</b>  |                             |                                     |
| <b>3</b>  | <b>Nom</b>                  | HANNIBAL                            |
|   | <b>Prénoms</b>              | Laure                               |
| <b>Adresse</b>  | <b>Rue</b>                  | 728, rue de Fontcarrade Bât.1       |
|   | <b>Code postal et ville</b> | 13 14 10 17 10 MONTPELLIER          |
| <b>Société d'appartenance (facultatif)</b>  |                             |                                     |

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)**

**DU (DES) DEMANDEUR(S)**

**OU DU COMMISSAIRE**

(Nom et société du commissaire)

RECEVÉ LE 04/03/04





# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

**cerfa**  
N° 11235\*03

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 270601

|  |                             |                       |
|--|-----------------------------|-----------------------|
| <b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>   |                             | CP 61.127             |
| <b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>  |                             | 04 00 191             |
| <b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  |                             |                       |
| Procédé de production de caroténoïdes et bactéries mises en oeuvre   |                             |                       |
| <b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  |                             |                       |
| INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT(I.R.D)<br>COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (C.E.A)  |                             |                       |
| <b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>   |                             |                       |
| <b>1</b>   | <b>Nom</b>                  | VERMEGLIO             |
|  | <b>Prénoms</b>              | André                 |
| <b>Adresse</b>   | <b>Rue</b>                  | 390,chemin du Ventoux |
|  | <b>Code postal et ville</b> | 18141201 PERTUIS      |
| <b>Société d'appartenance (facultatif)</b>   |                             |                       |
| <b>2</b>   | <b>Nom</b>                  |                       |
|  | <b>Prénoms</b>              |                       |
| <b>Adresse</b>   | <b>Rue</b>                  |                       |
|  | <b>Code postal et ville</b> |                       |
| <b>Société d'appartenance (facultatif)</b>   |                             |                       |
| <b>3</b>   | <b>Nom</b>                  |                       |
|  | <b>Prénoms</b>              |                       |
| <b>Adresse</b>   | <b>Rue</b>                  |                       |
|  | <b>Code postal et ville</b> |                       |
| <b>Société d'appartenance (facultatif)</b>   |                             |                       |
| S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suiv du nombre de pages. |                             |                       |
| <b>DATE ET SIGNATURE(S)</b><br><b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b><br><b>OU DU MANDATAIRE</b><br>(Nom et qualité du signataire)               |                             |                       |
| PEAUCELLE Chantal<br>N°92-1189<br>Paris le 9 Janvier 2004  |                             |                       |